

دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات

عنوان

بررسی ارتباط میان بیان ژن C-myc و تغییرات پلی مورفismi پروموتور ژن hTERT و تاثیر آن
بر بیان ژن hTERT در بیماران مبتلا به سرطان پستان

استاد راهنما

دکتر سیدسعید حسینی اصل

استاد مشاور

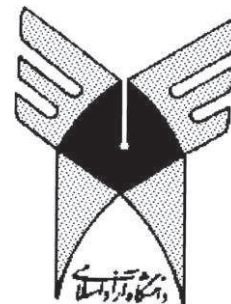
دکتر محمدرضا رضوی

نگارنده

زهرا شیرزاد

زمستان 89

Islamic Azad University
Science and Research Branch



Master of Science Cellular and Molecular Biology

Subject:

Investigation of the association between c-myc expression level and SNPs present in the hTERT promoter and their effect on hTERT expression in breast cancer patients

Supervisor:

S. Saied Hosseini-Asl PhD

Co - Supervisor:

Mohammadreza Razavi PhD

By:

Zohreh Shirzad

Winter 2010

تقدیر و تشکر

با تشکر از زحمات بی شائبه و الطاف بی پایان اساتید گرانقدرم ، آقای دکتر سید سعید حسینی اصل ، به عنوان استاد راهنما و آقای دکتر محمد رضا رضوی ، به عنوان استاد مشاور، که با رهنمودهای خود صحیح ترین راه و علمی ترین جاده ها را در پیش روی من قرار دادند.

و تشکرات بی پایان خود را از اساتید ارجمند ، آقای دکتر ارزنلو و آقای دکتر مآذنی و خانم مهندس اخوان و دوستان عزیزم خانمها آقازاده ، فتحی ، محمدی ، درستکار، و آقایان مهندس برزگر ، سروی ، نوروزی که دوستانه مرا در این راه یاری نمودند ؛ ابراز می دارم.

پدر و مادر عزیزم

به راستی که چون همیشه ، تحسین برانگیز است انتخاب زیبای خداوند ؛ که سفیران مهر و محبت خود را بر عرصهٔ بیرحم گیتی ، چه رؤفانه و مدبرانه ، برگزیده است . ودیعه دارانی که بی تمنا و خالصانه ، تمام هستی و قلب و روح خود را ، به فدای امانت الهی تقدیم می کنند.

چنین روح بلند مرتبه و ایثار بیکران ، تنها در وجود مادر و پدر نهفته شده است ؛ و من نیز اولین ثمره تلاش و تکاپویم را به پاس قدردانی از زحمات لحظه به لحظه پدر عزیزم و مادر بی نظیرم ، به پیشگاه ارجمندشان تقدیم می دارم ؛ با امید اینکه مقبول درگاهشان باشد.

آتوسا و پریسا ی عزیزم

حکایتهاست که پرستوها پیام آور بر حق خوشیها و شادکامگی ها در تمامی روزگاراند.

شایسته است خالصانه ترین سپاسها را به پیشگاه دوخواهر عزیزم ، خانم دکتر آتوسا و خانم دکتر پریسا شیرزاد ، که دو پرستوی شادی بخش دوران زندگیم بوده اند ، تقدیم دارم ؛ که همیشه یاریگر و نجات بخش من از سختی ها بوده اند.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده	1
فصل اول : کلیات	
1-2- تلومر	5
1-3- تلومراز	12
1-4- مجموعه عملکردهای تلومراز	13
1-4-1- ساختار زیر واحد hTR	13
1-4-2- ساختار زیر واحد کاتالیتیکی hTERT	16
1-4-3- پروتئینهای متصل شونده به hTR	19
1-4-4- پروتئینهای متصل شونده به hTERT	20
1-5- فعالیت تلومراز	21
1-5-1- محل جایگاه ژن hTERT و سازماندهی آن	21
1-5-2- خصوصیات پروموتور hTERT	22
1-6- تنظیم بیان ژن hTERT	23
1-6-1- فعالسازی رونویسی از ژن hTERT	23
1-6-1-1- c-myc	23
1-6-1-2- Sp1	24
1-6-1-3- استروژن	25
1-6-1-4- پروژسترون	25
1-6-2- مهار رونویسی از ژن hTERT	26
1-6-2-1- Mad1	26
1-6-2-2- P53	26
1-6-2-3- pRb , E2F	27
1-7- تنظیم بیان ژن hTR	28

- 1-7-1- تنظیم بیان ژن hTR از طریق رونویسی..... 28
- 1-7-2- تنظیم بیان ژن hTR از طریق مسیر علامت دهی سلولی..... 29
- 1-7-3- تنظیم بیان ژن hTR از طریق متیلاسیون..... 29
- 1-7-4- تنظیم بیان ژن hTR از طریق شکل گیری مجدد کروماتین..... 29

فصل دوم : مروري بر تحقیقات گذشته

- 1-2- پیشینه..... 32

فصل سوم: مواد و روشها

- 1-3- جامعه آماری و حجم نمونه..... 34
- 1-1-3- جامعه آماری..... 34
- 2-1-3- حجم نمونه..... 34
- 2-3- مواد لازم..... 34
- 1-2-3- مواد لازم برای استخراج DNA..... 34
- 2-2-3- مواد لازم برای استخراج DNA و RNA از بافت توموری..... 35
- 3-2-3- مواد لازم برای انجام Polymerase Chain Reaction (PCR)..... 35
- 1-3-2-3- مخلوط واکنش PCR..... 35
- 2-3-2-3- مواد لازم برای الکتروفورز DNA (آگاروز)..... 38
- 4-2-3- مواد لازم برای ساخت cDNA از RNA توموری..... 39
- 5-2-3- مواد لازم برای انجام Real Time PCR..... 39
- 3-3- وسایل مورد نیاز..... 40
- 1-3-3- وسایل مورد نیاز جهت جمع اوری و نگهداری نمونه ها..... 40
- 2-3-3- وسایل لازم جهت استخراج RNA , DNA..... 41
- 3-3-3- وسایل لازم جهت انجام واکنش PCR و Real Time-PCR..... 41
- 4-3-3- وسایل لازم برای شکست بافت توموری..... 41
- 5-3-3- وسایل لازم جهت تهیه ژل الکتروفورز آگاروز..... 42
- 4-3- دستگاههای مورد استفاده..... 42

42	3-5- روش کار.....
42	3-5-1- تهیه اب فاقد Rnase (DEPC – treated).....
43	3-5-2- جمع آوری نمونه.....
43	3-5-3- استخراج DNA از خون.....
44	3-5-4- واکنش زنجیره ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction).....
44	3-5-5- PCR.....
45	3-5-6- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز.....
46	3-5-7- روش بستن تانک و قالبگیری ژل.....
46	3-5-8- استخراج DNA و RNA از نمونه توموری بیماران.....
48	3-5-9- روش سنتز cDNA.....
48	3-5-10- روش انجام Real Time- PCR.....
49	3-6- محاسبه آماری داده ها.....

فصل چهارم : نتایج

51	4-1 : نتایج.....
53	4-2 : نتایج آماری داده ها.....
56	4-3 : نتایج آماری ارتباط بیان ژنها و اطلاعات پاتولوژیکی بیماران مورد مطالعه.....

فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری

67	بحث و نتیجه گیری.....
71	فهرست منابع.....
83	چکیده انگلیسی.....

فهرست جداول

جدول 3-1 : شرایط دمایی جهت تکثیر Promoter hTERT	36
جدول 3-2 : توالی الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در بررسیهای PCR برای ژن hTERT promoter	36
جدول 3-3 : شرایط دمایی جهت تکثیر hTERT Promoter (f3-1 , r3-1)	37
جدول 3-4 : شرایط دمایی جهت تکثیر hTERT Promoter (f3-2 , r3-2)	37
جدول 3-5 : توالی الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در بررسیهای PCR برای ژن β - actin	37
جدول 3-6 : شرایط دمایی جهت تکثیر ژن β - actin	38
جدول 3-7 : توالی الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده primers, probes در بررسیهای Real Time-PCR برای ژن GAPDH	39
جدول 3-8 : توالی الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده primers, probes در بررسیهای Real Time-PCR برای ژن hTERT	40
جدول 3-9 : توالی الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده primers, probes در بررسیهای Real Time-PCR برای ژن c-myc	40
جدول 4-1 : جدول P-Value ارتباط بیان داده های بیان ژن hTERT و ژن c-myc در بیماران مورد مطالعه	55
جدول 4-2 : جدول P-Value ارتباط میان تغییرات بیان ژن hTERT و درجه سرطانی در بیماران مورد مطالعه	56
جدول 4-3 : جدول P-Value ارتباط میان تغییرات بیان ژن c-myc و درجه سرطانی در بیماران مورد مطالعه	56
جدول 4-4 : جدول P-Value ارتباط میان بیان ژن hTERT و مرحله بیماری در بیماران مورد مطالعه	57
جدول 4-5 : جدول P-Value ارتباط میان بیان ژن c-myc و مرحله بیماری در بیماران مورد مطالعه	57
جدول 4-6 : جدول P-Value ارتباط میان بیان ژن hTERT و ALN در بیماران مورد مطالعه	58
جدول 4-7 : جدول P-Value ارتباط میان بیان ژن c-myc و ALN در بیماران مورد مطالعه	58
جدول 4-8 : جدول P-Value ارتباط میان تغییرات بیان ژن های c-myc و hTERT در بیماران مورد مطالعه	59

چکیده :

سرطان سینه ، شایعترین سرطان در میان زنان می باشد؛ و در این سلولهای سرطانی نیز مانند دیگر سلولهای سرطانی ، آنزیم تلومراز بیان بالایی حاصل می کند. تلومراز، یک آنزیم DNA پلیمراز وابسته به RNA می باشد که توالی تلومری انتهای کروموزومها را سنتز می کند و باعث تکثیر نامحدود سلولها می شود.

تلومراز ، یک آنزیم رونوشت بردار معکوس می باشد که از توالی RNA خود، بعنوان الگوی سنتز توالی تلومر، استفاده می کند. آنزیم تلومراز از دو جزء تشکیل شده است : پروتئین کاتالیتیکی به نام hTERT و توالی RNA به نام hTERC .

c-myc ، یک انکوژن شناخته شده است که تکثیر و رشد سلول را افزایش می دهد. بطوریکه هر گونه تغییر در ساختار آن و یا در بیان آن ، باعث طیف وسیعی از سرطانهای انسانی می شود. این پروتئین به جایگاههایی به نام E-box متصل شده بر بیان ژن حاوی آن از جمله ژن hTERT اثر می گذارد.

مواد و روشها : در این آزمایش از 44 بیمار مبتلا به سرطان سینه در بیمارستان دی تهران نمونه برداری شد. سپس با استفاده از تکنیک PCR ، پروموتر ژن hTERT از لحاظ پلی مورفیسم بررسی شد. همچنین با تکنیک Real- Time PCR ، میزان بیان ژنهای hTERT و c-myc اندازه گرفته شد.

نتایج : پلی مورفیسم مؤثری در ، پروموتر ژن hTERT دیده نشد. اما با توجه به نتایج اعلام شده در بخشهای بعدی، ارتباطات معنی داری میان بیان دو ژن hTERT و c-myc حاصل شد. گرچه ارتباطات معنی داری میان بیان این دو ژن و داده های پاتولوژیکی بدست نیامد.

بحث : با استناد بر نتایج حاصل از این آزمایش ، می توان راهکارهای مناسبی را برای کاهش میزان بیان ژن hTERT و فعالیت تلومراز طرح ریزی کرد.

واژه های کلیدی : سرطان سینه، تلومراز ، hTERT ، c-myc

فصل اول:

کلیات

1-1- کلیات :

سرطان سینه از دوران باستان مورد توجه بوده است و برای اولین بار توسط Edwin Smith در 2500 سال قبل از میلاد مسیح بر روی کاغذ های پاپيروس نگاشته شده است. در این نوشته، تومور بعنوان توده ی سرد و سخت معرفی شده است. این توده بعنوان مهمترین تومور بدخیم مهاجم پستان شناخته شده است که از سلولهای اپیتلیوم پارانشیمی پستانی نشأت می گیرد. این تومور با اثر تهاجمی به بافتهای مجاور شناخته می شود و تمایل زیادی برای ایجاد متاستاز در جایگاههای دور از منشأ سرطان دارد که معمولترین این جایگاهها شامل استخوانها، ریه، کبد، تخمدان، پوست و مغز می باشد. در مطالعات پزشکی، سرطان سینه به دو صورت طبقه بندی می شود: در یکی از روشها مطابق TNM دسته بندی می شود (T: اندازه تومور، N: وجود متاستاز در غدد لنفاوی، M: فاصله متاستاز از بافت منشأ سرطان) و در روش دیگر بر اساس سوابق تاریخی بیماری دسته بندی می شود که بر اساس پارامترهای تشکیل غده، پلی مورفیسم هسته و وقایع میتوزی طبقه بندی می شود (99).

پزشکان از همان دوران باستان در صدد التیام مبتلایان بوده اند. جراحان روشهای درمانی جدیدی را پیشنهاد می کردند و اناتومیستها نیز با تعاریف ماهرانه ی خود از ساختار فیزیولوژی بدن، اطلاعات بسیار ارزنده ای را به هنر درمان افزودند. با پیشرفت مداوم علم در قرن بیستم و گسترش شیمی درمانی، رادیو درمانی و بسیاری روشهای پزشکی، دستاوردهای ارزشمندی در مسیر کنترل و درمان سرطان سینه حاصل شد (2).

امروزه سرطان سینه جزء شایعترین سرطانها میان زنان جهان می باشد که شامل 22% سرطانهای زنان جهان می باشد. یک تفاوت بارز در میزان ابتلای افراد به سرطان سینه یا زیستن در مناطقی با ریسک بالای ابتلا به سرطان سینه یا زیستن در مناطقی با ریسک پایین ابتلا به سرطان سینه می باشد (86). تعداد افراد مبتلا به این بیماری بخصوص در کشورهای صنعتی شده از جمله کشورهای امریکای شمالی و اروپای غربی بسیار بالاست (57)، بطوریکه امریکای شمالی و اروپا که 16% جمعیت جهان را شامل می شوند، 60% مبتلایان به سرطان سینه را نیز در بر می گیرند. ولی ریسک ابتلا به سرطان سینه در کشورهای شرق دور، آفریقا و امریکای جنوبی بسیار پایین می باشد (86).